

## UJI KEMAMPUAN ISOLAT BAKTERI TANAH VULKANIK UNTUK MENDEGRADASI HIDROKARBON TERHALOGENASI

Endang Sutariningsih Soetarto\*

### ABSTRAK

Soetarto, E.S., 1997. Uji kemampuan bakteri tanah vulkanik untuk mendegradasi senyawa hidrokarbon terhalogenasi. *Biologi*, 2(3) : 129-142.

Senyawa organik terhalogenasi, asam haloalkanoat dan haloalkana dapat termineralisasi dalam kultur diperkaya yang mengandung bakteri tanah vulkanik. Beberapa isolat bakteri telah ditemukan mampu menggunakan asam haloalkanoat dan haloalkana sebagai sumber karbon dan energi. Hampir sebagian besar isolat mempunyai ciri-ciri golongan korinebakteri. Isolat-isolat bakteri tersebut menghasilkan dua macam enzim dehalogenase secara konstitutif. Satu enzim adalah spesifik untuk haloalkana, sedangkan yang lain adalah spesifik untuk asam haloalkanoat. Asam haloalkanoat-dehalogenase bersifat termotabil. Aktivitas optimum haloalkanoat-dehalogenase stabil pada suhu 60°C dengan pH 9,0 dan sangat peka terhadap gugus thiol. Kedua dehalogenase tersebut mempunyai spesifisitas substrat yang luas, sehingga enzim tersebut diharapkan mampu mendegradasikan senyawa organoklorin lain. Isolat bakteri pengguna asam haloalkanoat diidentifikasi sebagai *Pseudomonas* sp., sedangkan isolat perombak haloalkana didominasi oleh bakteri yang mempunyai ciri-ciri seperti *Arthrobacter* sp. Hasil analisis menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. strain D4MCPA4 dan *Arthrobacter* sp. strain D4CH2 adalah strain yang dapat diharapkan mempunyai peran utama dalam biotransformasi senyawa organoklorin dan menghasilkan dehalogenase hidrolitik yang terlibat didalam metabolisme rantai pendek hidrokarbon terhalogenasi.

Kata kunci : Bakteri tanah vulkanik, biodegradasi, hidrokarbon terhalogenasi

### ABSTRACT

Soetarto, E.S. 1997. Study on the ability of volcanic soil bacteria on the degradation of halogenated hydrocarbons. *Biologi*, 2(3) : 129-142.

Halogenated compounds, haloalkanoic acids and haloalkanes, were mineralized by the enrichment cultures containing bacteria from volcanic soils. The bacterial isolates were found to have ability to use haloalkanoic acids and haloalkanes as the sole carbon and energy sources. Most of isolates were described as coryneform group.

\*Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

It was found that the bacterial isolates constitutively produced two different dehalogenases. One was specific only for haloalkanes, whereas the other was specific for haloalkanoic acids. The haloalkanoic acid-dehalogenase was thermostable, with an optimal activity at 60°C, pH 9.0 and sensitive to thiol group. Both enzymes were observed to show a broad substrate specificity, allowing the degradation of various organochlorine compounds. An isolate capable of utilizing haloalkanoic acid was identified as a *Pseudomonas* sp. and haloalkane degrading bacteria was predominated by *Arthrobacter* sp. Analysis revealed that *Pseudomonas* sp. strain D4MCPA4 and *Arthrobacter* sp. strain D4CH2 are promising strains that play an important role in dehalogenation of organochlorine compounds and produced hydrolytic dehalogenases that may be involved in the microbial metabolism of short chain halogenated hydrocarbons.

*Key words* : *Vulcanic soil bacteria, biodegradation, halogenated hidrocarbon*

## PENDAHULUAN

Hampir semua proses detoksifikasi atau proses pemusnahan polutan di alam melibatkan aktivitas mikrobial. Mikrobial, khususnya bakteri telah banyak diteliti mampu mendegradasi berbagai senyawa hidrokarbon alifatik terhalogenasi. Senyawa hidrokarbon terhalogenasi merupakan salah satu komponen utama polutan. Namun demikian, senyawa terhalogenasi merupakan target utama di dalam proses bioteknologi, karena senyawa tersebut diproduksi secara besar-besaran untuk memenuhi berbagai keperluan, antara lain digunakan untuk meningkatkan kualitas produk industri dan tahan terhadap bio-

degradasi. Beberapa senyawa terhalogenasi yang banyak diproduksi adalah organoklorin. Beberapa senyawa organoklorin digunakan sebagai bahan dasar cat, pelarut kimia, agensia pelarut lemak, pestisida dan bahan antara untuk sintesis berbagai senyawa organik lain (Hileman *et al.*, 1994). Masalah yang timbul pada industri bahan kimia tersebut adalah residu senyawa terhalogenasi yang lepas ke lingkungan. Senyawa tersebut mempunyai potensi sebagai pencemar lingkungan karena sifatnya yang rekalsitran dan karsinogenik. Sifat rekalsitran tersebut disebabkan oleh gugus klorida yang terikat pada rantai

atom C sehingga menyebabkan senyawa terklorinasi tahan terhadap biodegradasi (Hardman, 1991; Neilson, 1996). Hanya beberapa bakteri tanah mampu mendegradasi senyawa tersebut (Omori & Alexander 1978; Hardman & Slater, 1981) dan bakteri tersebut mempunyai peran penting dalam transformasi berbagai hidrokarbon menjadi senyawa yang non toksik (Sallis *et al.*, 1990; Leisinger & Bader 1993; Armfield *et al.*, 1995; Soetarto, 1995). Namun demikian informasi mengenai kerentanan hidrokarbon terhalogenasi terhadap biodegradasi masih belum terungkap secara detail. Beberapa usaha melalui pendekatan secara genetik telah dilakukan untuk memperoleh strain bakteri yang mempunyai aktivitas degradatif tinggi. Strain tersebut kemudian dikembangkan sebagai agen pembersih lingkungan tercemar. Tujuan penelitian ini ialah untuk mendapatkan bakteri yang mempunyai kemampuan tinggi dalam degradasi hidrokarbon terhalogenasi. Tanah vulkanik Dieng merupakan sumber bakteri dehalogenasi yang potensial. Diharapkan hasil penelitian ini dapat diaplikasikan untuk memperbaiki lingkungan

yang tercemar bahan xenobiotik khususnya hidrokarbon terhalogenasi.

## BAHAN DAN METODE

### *Mikrobia dan kondisi pertumbuhannya*

Beberapa bakteri diisolasi dari sampel tanah melalui kultur diperkaya yang berisi senyawa terhalogenasi sebagai sumber karbon dan energi. Sampel sedimen vulkanik (5 g) yang diambil dari beberapa tempat sekitar Kawah Sileri dan lava kawah Si Kidang (Dataran Tinggi Dieng), diinokulasi ke 100 ml medium pertumbuhan di dalam 250 ml labu Erlenmeyer. Medium pertumbuhan (Slater *et al.*, 1979) terdiri dari larutan garam basal (SBS) yang tersusun atas ( $\text{g l}^{-1}$ ): 1.5 -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dan 0.2- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Medium basal tersebut dilengkapi dengan larutan unsur *trace* (*trace elements*) yang terdiri dari ( $\text{g l}^{-1}$ ): 12- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 2- $\text{NaOH}$ , 1- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.4- $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1- $\text{CuSO}_4$ , 0.5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, 10- $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.1- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2- $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 0.2- $\text{MnSO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , dilarutkan kedalam 1 l akuades dan substrat

terdiri dari 1-monokloroasetat (MCA), 2-monokloro-propionat dan 1-kloroalkana (1-kloropropana, 1-klorobutana, 1-kloropentana dan 1-kloroheksana) ( $0,5 \text{ g C l}^{-1}$ ).

Kultur diperkaya tersebut diinkubasi di atas *shaker* pada  $30^\circ\text{C}$  selama 4 hari. Setelah melalui 3 kali subkultur, bakteri diisolasi melalui pengenceran seri dan ditumbuhkan pada medium pertumbuhan (SB) padat dengan substrat yang sama dan nutrisi agar. Koloni yang tumbuh pada medium tersebut dipindahkan ke nutrisi agar miring, disimpan untuk percobaan selanjutnya.

#### Uji kemampuan tumbuh isolat pada substrat

Uji kemampuan tumbuh untuk masing-masing isolat dilakukan dengan menggunakan medium pertumbuhan cair dengan substrat yang sama seperti pada kultur diperkaya. Pertumbuhan dan aktivitas bakteri dipantau dengan mengukur kerapatan sel secara spektrofotometri ( $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ ) dan ion Cl yang terlepas di dalam medium dengan Chlor-o-counter. Uji kemampuan tumbuh isolat pada berbagai senyawa terhalo-

genasi (haloalkanoat, haloalkana dan haloalkohol) dilakukan untuk mengetahui substrat spesifik yang dapat digunakan oleh isolat tersebut.

#### Preparasi ekstrak bebas sel (Cell-free extract/CFE)

Kultur bakteri terpilih yang mampu mendegradasi haloalkanoat (MCA, 2MCPA) atau haloalkana (1-kloroheksana, 1CH) ditumbuhkan masing-masing di dalam 100 ml medium cair baru dengan substrat yang telah ditentukan pada kondisi yang sama selama 48 jam. Kultur tersebut kemudian diinokulasikan ke dalam 2 l medium pertumbuhan cair, yang masing-masing mengandung substrat yang sesuai dengan semula, diinkubasi pada kondisi yang sama selama 2 - 4 hari. Untuk mendapatkan jumlah biomasa yang tinggi, sebelum inokulasi medium pertumbuhan ditambah dengan  $0,005 \text{ g l}^{-1}$  ekstrak khamir.

Setelah mencapai fase pertumbuhan eksponensial akhir, sel bakteri dipanen dengan cara sentrifugasi ( $8.000 \text{ g}$ ; suhu  $4^\circ\text{C}$ , selama 15 menit). Pelet dari kultur isolat pengguna haloalkanoat

dicuci dua kali dengan buffer 50 mM Tris- $\text{SO}_4$  pH 7,9, kemudian diresuspensi dengan 200 mM Tris- $\text{SO}_4$  pH 7,9 yang telah diberi 1 mM DL-dithiotreitol (DTT). Pelet dari kultur bakteri pengguna haloalkana dicuci dengan buffer 100 mM Glisin-NaOH pH 9,1 dua kali, kemudian diresuspensi dengan buffer yang sama. Suspensi sel dihancurkan melalui *French pressure cell*, sebanyak dua kali. Campuran sel hancur tersebut disentrifugasi ( $20.000 \text{ g}$ ; suhu  $4^\circ\text{C}$ ; selama 30 menit) untuk memisahkan sel-sel yang masih utuh dan dinding sel dari supernatan yang dihasilkan CFE.

#### Uji aktivitas enzim

Aktivitas dehalogenase dalam CFE ditentukan berdasarkan jumlah ion Cl yang terlepas dari substratnya. Aktivitas haloalkanoat-dehalogenase diukur dengan menggunakan larutan buffer 20 mM Tris- $\text{SO}_4$  pH 7,9 (Weightman *et al.*, 1982). Enzim kasar dalam CFE ( $200 \mu\text{l}$ ) dimasukkan ke dalam 5 ml 20 mM Tris- $\text{SO}_4$  yang telah diberi  $5 \mu\text{l}$  DTT. Campuran reaksi tersebut diinkubasikan pada pemanasan air ( $30^\circ\text{C}$ ) selama 10 menit. Aktivitas diamati dengan

menambahkan substrat dengan konsentrasi akhir sekitar 20 mM. Setiap interval waktu tertentu (5 menit), diukur jumlah ion Cl yang terlepas. Aktivitas haloalkana-dehalogenase, ditentukan menggunakan 100 mM Glisin-NaOH pH 9,1 ditambah substrat (10 mM) (Sallis *et al.*, 1990). Uji aktivitas dehalogenase dimulai dengan menambahkan CFE, dan setiap interval waktu tertentu (15 menit), ion Cl yang terlepas dari substrat diukur dengan titrasi (Bergman & Samik 1957). Satu unit aktivitas enzim adalah aktivitas yang mengkatalisis pembentukan 1  $\mu\text{mol}$  ion Cl per mg protein per menit.

#### Penentuan suhu dan pH optimum untuk aktivitas dehalogenase

Suhu optimum aktivitas dehalogenase ditentukan dengan menginkubasikan campuran reaksi enzim pada berbagai suhu. Penentuan aktivitas dehalogenase dikerjakan seperti tertera pada uji aktivitas enzim. Penentuan pH optimum dilakukan dengan menggunakan buffer yang pHnya bervariasi untuk resuspensi dan uji enzim. Aktivitas enzim pada pH 6,0 sampai 7,0 diukur meng-

gunakan 50 mM buffer fosfat, sedangkan untuk pH tinggi (pH 5 sampai 10,0) diukur dengan menggunakan 50 mM Glisin-HaOH atau 50 mM Tris-SO<sub>4</sub> (Weightman *et al.*, 1992).

### Pengaruh ko-faktor dan logam terhadap aktivitas enzim

Pengaruh ko-faktor dan logam terhadap aktivitas dehalogenase dikerjakan dengan menambahkan berbagai ko-faktor dan logam (1 mM) kedalam larutan reaksi uji enzim. Kemudian aktivitas diukur seperti tertera pada uji aktivitas enzim. Konsentrasi protein ditentukan dengan metoda Bradford (1976) dengan BSA sebagai standar.

### Elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE)

Dehalogenase divisualisasikan dengan gel poliakrilamida elektroforesis natif (Hardman & Slater 1981; Sallis *et al.*, 1991). CFE yang telah dibubuhi buffer cat dielektroforesis pada suhu 4°C. Gel kemudian direndam ke dalam larutan buffer 100 mM Tris-SO<sub>4</sub> pH 7,9 yang mengandung 30 mM haloalkanoat, diinkubasi pada suhu

37°C selama 45 menit, dicuci dengan akuades dan dimasukkan kedalam larutan 100 mM AgNO<sub>3</sub>. Posisi haloalkanoat-dehalogenase dalam gel ditunjukkan sebagai pita putih yang merupakan hasil presipitasi AgCl. Pita haloalkanoat-dehalogenase nampak pada gel yang telah diemulsi dengan haloalkana (30-50 mM) sebagai zona jernih setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakterisasi isolat bakteri

Isolasi bakteri dari beberapa kultur diperkaya sekali panen (*batch enrichment culture*) yang mengandung MCA dan 2MCPA sebagai substrat pertumbuhan diperoleh berbagai macam isolat yang dapat dibedakan sebagai bakteri yang tumbuh lambat (*slow growing bacteria*) dan bakteri yang mampu tumbuh cepat (*fast growing bacteria*). Bakteri strain D4MCA1 dan D4MCPA4 merupakan bakteri pengguna haloalkanoat yang mampu tumbuh cepat, masing-masing pada MCA dan 2MCPA sebagai sumber karbon dan energi. Strain D4CH2 adalah satu-satunya isolat bakteri pengguna haloalkana yang

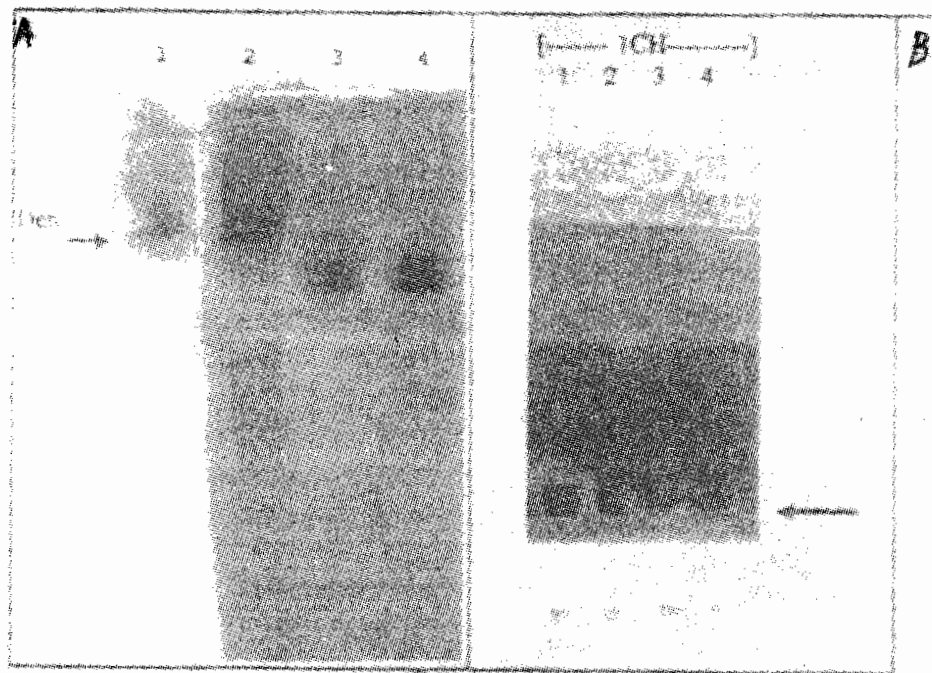
mampu tumbuh cepat pada 1CH sebagai sumber karbon dan energi. Ketiga strain tersebut berasal dari kultur diperkaya sekali panen yang diinokulasi dengan sedimen lava dari Kawah Sileri (Dieng). Kedua bakteri strain D4MCA1 dan D4MCPA4 mempunyai ciri-ciri hampir sama. Bentuk sel batang pendek, Gram-negatif, oksidase negatif, katalase positif, kandungan molekul G:C sekitar 60%, dan diidentifikasi sebagai *Pseudomonas* sp. Strain pengguna asam haloalkanoat tersebut mampu menggunakan berbagai macam asam

haloalkanoat, tetapi tidak mampu menggunakan haloalkana. Kedua strain tersebut menghasilkan dehalogenase spesifik secara konstitutif karena aktivitasnya dapat juga ditunjukkan pada ekstrak bebas sel dari kultur yang tumbuh pada media yang mengandung suksinat sebagai sumber karbon. Asam haloalkanoat-dehalogenase aktif mengkatalisis dehalogenasi berbagai mono dan di-kloroalkanoat (Tabel 1) yang dapat dideteksi berdasarkan kecepatan melepaskan ion Cl<sup>-</sup>. Hasil analisis menunjukkan bahwa MCA merupakan substrat yang

Tabel 1. Spesifisitas substrat untuk dehalogenase pada ekstrak bebas sel

Substrat	Aktivitas dehalogenase relatif (%)*		
	Strain D4MCA1	D4MCPA-4	D4CH2
<b>Haloalkanoat:</b>			
Monokloroasetat	100	95	0
Dikloroasetat	75	30	0
Trikloroasetat	3	0	0
2-Monokloropropionat	80	100	0
1,2-dikloropropionat	0	0	0
<b>Haloalkana :</b>			
1-kloropropana	0	0	3
1-klorobutana	0	0	53
1-kloropentana	0	0	94
1-kloroheksana	0	0	100
1-kloroheksanadekana	0	0	0
<b>Haloalkohol:</b>			
3-kloropropan-2-ol	10	20	20
Dikloropropanol	5	35	40

\*: Aktivitas relatif ditentukan berdasarkan aktivitas dehalogenase terhadap substrat pertumbuhannya



Gambar 1. Gel poliakrilamida dengan dehalogenase dari ekstrak sel beberapa strain

Lajur 1. Ekstrak sel *Pseudomonas putida* strain PP3; Lajur 2. Ekstrak sel *Pseudomonas* sp strain D4MCA1; Lajur 3 dan 4. Ekstrak sel dari *Pseudomonas* sp strain D4MCPA4 yang masing-masing ditumbuhkan pada MCA dan 2MCPA.

Gel yang diemulsikan dengan 1CH dengan dehalogenase dari ekstrak sel strain D4CH2 (Rf:0.9). Lajur 1, 2, 3, dan 4: masing-masing gel diemulsi dengan 1CP, 1CB, 1CPT, dan 1CH.

...aling baik. Strain D4MCPA4 menghasilkan dua macam dehalogenase konstitutif dan inducibel. Dehalogenase pertama bersifat konstitutif (disintesis tanpa adanya substrat enzim), aktif mengkatalisis degradasi MCA, dan dehalogenase kedua aktif setelah diinduksi dengan adanya substrat

2MCPA. Dengan demikian 2MCPA merupakan substrat yang paling baik dalam uji aktivitas enzim strain D4MCPA4. Dehalogenase yang dihasilkan oleh strain D4MCPA4 tersebut termasuk dalam 2-haloalkanoat dehalogenase. Hasil pengamatan kinetika enzim, aktivitas kedua dehalo-

genase mengikuti kinetika Michaelis-Menten dan dengan konsentrasi 2MCPA yang berbeda memberikan  $K_m = 0.215 \text{ mM}$ .

Dehalogenase yang dihasilkan oleh kedua strain *Pseudomonas* sp tersebut berbeda dari dehalogenase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas putida* strain PP3 (Slater *et al.*, 1979). Gel poliakrilamida dengan beban ekstrak bebas sel kedua strain tersebut menampilkan posisi dan pola pita berbeda (Gambar 1). Ekstrak bebas sel dari strain D4MCPA4 yang tumbuh pada MCA tidak menghasilkan dehalogenase tipe kedua. Hasil tersebut dapat dilihat dengan tidak munculnya pita kedua pada gel poliakrilamida (Gambar 1). Salah satu isolat bakteri yang mampu tumbuh cepat pada kloroalkana adalah strain D4CH2, diisolasi dari kultur diperkaya yang mengandung 1CH diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$ . Bakteri tersebut mempunyai ciri-ciri : sel berbentuk batang melengkung tidak berspora, Gram-positif, motil, mampu memetabolismekan glukosa secara oksidatif, tetapi oksidase negatif dan katalase positif. Koloni sirkuler, halus, berwarna kuning muda, semitrans-

lusen dan kenampakan koloni dari samping sedikit cembung. Strain tersebut mempunyai ciri-ciri seperti *Arthrobacter* sp. (Holt, 1977), mampu tumbuh cepat pada 1CH dengan  $\mu_{\text{max}} = 0.150 \text{ jam}^{-1}$ .

#### Aktivitas haloalkana-dehalogenase pada ekstrak sel

Haloalkana-dehalogenase yang dihasilkan oleh *Arthrobacter* sp. strain D4CH2 adalah enzim yang inducibel, disintesis dan aktif bila ada 1CH sebagai sumber karbon dan energi. Haloalkana-dehalogenase tersebut aktif mengkatalisis dehalogenasi senyawa hidrokarbon alifatik dengan panjang rantai C sekitar 1 sampai 16 (Tabel 1). Haloalkanoat bukan merupakan substrat enzim tersebut. Aktivitas haloalkana-dehalogenase tertinggi ditunjukkan pada ekstrak sel kasar, aktivitasnya lima kali lebih tinggi daripada aktivitas yang ditunjukkan oleh ekstrak bebas sel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa halo-alkana-dehalogenase yang dihasilkan oleh strain D4CH2 adalah enzim terikat membran sel (Slater *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1994).



### Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim

Haloalkanoat-dehalogenase pada ekstrak bebas sel strain D4MCA1 dan 2-haloalkanoat-dehalogenase dari strain D4MCPA4 mempunyai aktivitas optimum pada kisaran pH yang sama yaitu pH 7,9-8,0, sedangkan haloalkanoat-dehalogenase dari strain D4CH2 mempunyai aktivitas optimum pada pH 9,5.

Kecepatan reaksi dehalogenasi yang dikatalisis ekstrak sel *Pseudomonas* sp. strain D4MCPA4 dan *Arthrobacter* sp. strain D4CH2 masing-masing menggunakan 2MCPA dan 1CH sebagai substrat enzim ditentukan pada pH 9,0 dengan suhu yang berbeda. Kecepatan dehalogenasi tertinggi dikatalisis sel ekstrak strain D4MCPA4 terjadi pada suhu 60°C sedangkan aktivitas dehalogenasi tertinggi yang dikatalisis ekstrak sel strain D4CH2 berlangsung pada suhu 37°C. Setelah ekstrak sel masing-masing isolat tersebut diinkubasikan pada suhu berbeda selama 15 menit, ekstrak sel masih mampu menunjukkan aktivitas enzim. Enzim 2-haloalkanoat-dehalogenase yang diinkubasi pada

suhu 37°C, 50°C, 60°C, 70°C masih mempunyai aktivitas perombakan 2MCPA masing-masing sebesar 100%, 80%, 65%, 5% dan enzim tersebut kehilangan aktivitasnya setelah diinkubasi pada suhu 80°C. Demikian pula pengaruh suhu terhadap aktivitas haloalkanoat-dehalogenase dengan 1CH sebagai substrat masih mempunyai kisaran yang sama, tetapi haloalkanoat-dehalogenase tidak aktif setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 menit.

### Pengaruh ko-faktor dan logam terhadap aktivitas enzim

Beberapa ko-faktor dan ion logam mempengaruhi aktivitas dehalogenase (Tabel 2). Kedua tipe dehalogenase dari isolat yang dibahas, hampir tidak teraktivasi oleh logam yang diujikan. Semua aktivitas dehalogenase yang diuji dihambat total dengan adanya HgCl<sub>2</sub> dan p-kloromerkuribensoat. EDTA tidak mempengaruhi aktivitas ke tiga dehalogenase yang diuji.

Bakteri perombak haloalkanoat, *Pseudomonas* sp. strain D4MCA1 dan strain D4MCPA4 tergolong bakteri mesofilik yang

Tabel 2. Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim

Reagensia	Aktivitas dehalogenase tersisa (%)		
	Strain D4MCA1	Strain D4MCPA4	Strain D4CH2
HgCl <sub>2</sub>	0	0	0
p-kloromerkuribensoat	0	0	0
N-asetilmaleida	5	10	30
PbNO <sub>3</sub>	35	70	10
CuSO <sub>4</sub>	45	68	10
ZnSO <sub>4</sub>	60	75	70
MnSO <sub>4</sub>	120	109	100
EDTA	100	100	100
Ekstrak sel	100	100	100

diisolasi dari sedimen vulkanik Kawah Sileri yang mempunyai pH netral. Strain-strain tersebut mampu tumbuh cepat pada haloalkanoat dengan  $\mu_{max}$  masing-masing 0,210 dan 0,219 jam<sup>-1</sup>, dan mempunyai aktivitas spesifik 6-10 kali lebih tinggi dari pada *Pseudomonas* lain yang telah dilaporkan (Weightman *et al.*, 1982; Hardman & Slater, 1981; dan Liu *et al.*, 1994). Selain itu *Pseudomonas* sp. strain D4MCPA4 mempunyai dua tipe dehalogenase yang posisinya pada gel poliakrilamida berbeda dengan dehalogenase *Pseudomonas putida* strain PP3 (Slater *et al.*, 1979) (Gambar 1). Deklorinasi 2MCPA terjadi hampir sempurna dikatalisis oleh ekstrak sel strain D4MCPA4 dalam waktu singkat

tanpa penambahan ko-faktor. Aktivitas dehalogenase tersebut tidak dihambat oleh konsentrasi substrat yang tinggi (200 mM). Toleransi terhadap konsentrasi substrat yang tinggi belum pernah dijumpai pada isolat tipe alami. Mengingat kemampuan yang tinggi dari strain-strain untuk merombak 2MCPA, yang merupakan salah satu hasil antara yang digunakan untuk sintesis beberapa pestisida atau herbisida atau senyawa sintesis lain, maka strain-strain tersebut dapat dimanfaatkan sebagai biokatalisator untuk mengurangi polutan dari lingkungan. Dehalogenasi haloalkanoat terjadi sangat eksklusif oleh *Arthrobacter* sp. strain D4CH2 yang tumbuh pada 1CH dengan  $\mu_{max} = 0,15$  jam<sup>-1</sup>, dengan

cepatan degradasi  $0,02 \text{ mol Cl}^- \cdot \text{jam}^{-1}$ . 1CH dirombak secara hidro- lis dengan menghasilkan heksa- l dan ion  $\text{Cl}^-$  bebas (Curragh *et al.*, 1994). Halo-alkana-dehalogenase da umumnya disintesis secara indu- sibel. Demikian pula dehalo- nase yang diproduksi *Arthro- bacter* sp. strain D4CH2 pada valnya bersifat inducibel, tetapi telah beberapa kali di subkultur, sim tersebut menjadi konstitutif. eadaan tersebut terbukti dengan lanya aktivitas dehalogenasi pada strak sel dari strain tersebut yang tumbuhkan pada medium Luria npa 1CH sebagai sumber karbon n energi. Karakter tersebut di- iliki pula oleh *Rhodococcus ery- ropolis* Y2 (Sallis *et al.*, 1990) dan *rhodococcus rhodochrous* NCIMB 3064 (Curragh *et al.*, 1994). Akti- tas haloalkana-dehalogenase alam CFE *Arthrobacter* sp. strain 4CH2 nampak sebagai zona rnihi pada gel poliakrilamida yang lah diemulsi dengan 1-kloro- kana dengan Rf sekitar 0.85-0.90 ang lebih besar dari pada Rf aloalkana-dehalogenase yang ihasilkan oleh *Rhodococcus erythro- polis* strain Y2 (Rf 0.75-0.80) (Sallis *et al.*, 1990).

## KESIMPULAN

Telah ditemukan strain bakteri perombak senyawa haloalkanoat dan senyawa haloalkana dari sedimen vulkanik Kawah Sileri (Dataran tinggi Dieng) yang mempunyai pH netral. Bakteri mesofilik perombak haloalkanoat, *Pseudomonas* sp. strain D4MCA1 dan strain D4MCPA4 mampu tumbuh cepat pada MCA dan 2MCPA dengan  $\mu_{\text{max}}$  masing- masing  $0,210$  dan  $0,219 \text{ jam}^{-1}$ , dengan aktivitas dehalogenase spesifik 6-10 kali lebih tinggi dari pada *Pseudomonas* yang lain. Iso- lat pengguna haloalkana adalah *Arthrobacter* sp. strain D4CH2, mampu tumbuh pada 1CH dengan  $\mu_{\text{max}} = 0,15 \text{ jam}^{-1}$ , dengan kecepatan degradasi  $0,02 \text{ mol Cl}^- \cdot \text{jam}^{-1}$ . *Pseudomonas* sp. strain D4MCPA4 dan *Arthrobacter* sp. strain D4CH2 yang mempunyai aktivitas tinggi memberikan hara- pan dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai agen re- mediasi lingkungan tercemar oleh senyawa terhalogenasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih dan pengharga- an setinggi-tingginya disampaikan

kepada ODA melalui the British Council Jakarta yang telah mem- beri dana untuk pelaksanaan studi ini. Demikian pula terima kasih kepada Direktur PAU-Biotekno- logi UGM beserta staf, dan kepada Drs. IGP. Badjra S. yang telah membantu memperbaiki penyus- sunan kalimat pada makalah ini.

## PUSTAKA ACUAN

- Armfield, S.J., P.J. Sallis, P.B. Baker, A.T. Bull. and D.J. Hardman., 1995. Dehalogenation of halo- alkanes by *Rhodococcus erythro- polis* Y2. The presence of an oxygenase type dehalogenase activity complements that hali- dohydrolase activity. *Biodegra- dation*, 60: 237-246.
- Bergman, J.G. and J. Samik, 1957. Determination of trace amounts of chloride in naphta. *Anal. Chem.*, 29: 241-243
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254
- Curragh, H., O. Flynn, M.J. Larkin, T.M.Stafford, J.T.G. Hamilton, and D.B. Harper, 1994. Halo- alkane degradation and assi- milation by *Rhodococcus rhodo- chrous* NCIMB 13064. *Microbiol.*, 140: 1433-1442
- Hardman, D.J., and J.H. Slater, 1981. Dehalogenases in soil bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 123: 117-128
- Hardman, D.J., 1991. Biotransfor- mation of halogenated com- pounds. *Crit. Rev. in Bio- technol.*, 11: 1-40
- Hileman, B., J.R. Long, and E.M. Kirschner, 1994. Chlorin indus- try running flat out despite persistent health fears. *Chem. Eng. News*, 72: 12-26
- Holt, J.G., 1977. *The shorter Bergeys manual of determinative bacterio- logy*. Eight edition. Williams dan Wilkins. Baltimore, Hong- kong.
- Janssen, D.B., F. Pries and J.R. Van der Ploeg, 1994. Genetics and biochmemistry of dehalogena- ting enzymes. *Ann. Rev. Micro- biol.*, 48: 163-191
- Jensen, H.L., 1960. Decomposition of chloroacetates and chloro- propionates by bacteria. *Acta Agric. Scan.*, 10: 83-103
- Leisinger, T. and R. Bader, 1993. Microbial dehalogenation of synthetic organohalogen com-

- pounds. Hydrolytic dehalogenases. *Chimia*, 47: 116-121
- Liu, J.Q., T. Kurihara, N. Esaki, and K. Soda, 1994. Reconsideration of the essential role of histidine residue of L-2-haloacid dehalogenase. *J. Biochem.*, 116: 248-249.
- Neilson, A.H., 1996. An environmental perspective on the biodegradation of organochlorine xenobiotics. *Internat. Biodeterioration and Biodegradation*, 3-21
- Omori, T. and M. Alexander, 1978. Bacterial dehalogenation of halogenated alkanes and fatty acids. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 867-871
- Sallis, P.J., S.J. Armfield, A.T. Bull, and D.J. Hardman, 1990. Isolation and characterization of a haloalkane halohydrase from *Rhodococcus erythropolis* Y2. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 115-120
- Slater, J.H., D. Lovatt, and A.J. Weightman, 1979. The growth of *Pseudomonas putida* PP3 on chlorinated aliphatic acids and its dehalogenase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 114: 125
- Slater, J.H., A.T. Bull, and D.J. Hardman, 1995. Microbial dehalogenation. *Biodegradation*, 6: 181-189
- Soetarto, E.S., 1995. *Dehalogenating bacteria from Indonesian volcanic sources*. PhD thesis at University of Wales College of Cardiff. UK
- Weightman, A.T., A.J. Weightman, and J.H. Slater, 1982. Stereospecificity of 2-monopropionate dehalogenation by the two dehalogenases of *Pseudomonas putida* PP3: evidence of two different dehalogenation mechanisms. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 1755-1762
- Weightman, A.T., A.J. Weightman, and J.H. Slater, 1992. Microbial dehalogenation of trichloroacetic acid. *World J. Microbiol. and Biotechnol.*, 8: 512-518.